

Partial Translation of
JP 60(1985)-214900 A

Publication Date : October 28, 1985

5 Application No. : 59(1984)-72557

Application Date : April 10, 1984

Applicant : FUJIMOTO DIAGNOSTICS LTD.

Inventor(s) : Yoshihiro KAWAGUCHI et al.

10 Title of the Invention :

AUTOMATED DETERMINATION OF TOTAL BILE ACID IN SERUM AND
REAGENT THEREFOR

15 Translation of Claim 1

2. Claims

(1) A method for automatically analyzing and measuring a total
concentration of a bile acid in blood serum, comprising:

adding an enzyme reagent solution A and an enzyme reagent
20 solution B to a sample blood serum, the enzyme reagent solution A being a
buffer solution of pH 6.5 to 7.5 containing 0.2 to 10.0 unit/ml of
NADH₂-dependent diaphorase, 1.0×10^{-4} to 10.0×10^{-4} M nicotinamide
adenine dinucleotide, and 0.05 to 0.5 mg/ml of nitroblue tetrazolium, the
enzyme reagent solution B being a buffer solution of pH 6.5 to 7.5
25 containing 0.1 to 1.0 unit/ml of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase; and
measuring an increase per unit time in absorbance at a
characteristic absorption band of diformazan that is formed by a reaction in
which a bile acid acts as a substrate.

30 Translation of page 556, upper right column, lines 2-12

On the other hand, in the enzyme colorimetry, a total concentration
of a bile acid in blood is determined as follows. When a bile acid (3 α -
hydroxysteroid) was converted into 3-ketosteroid by the action of
3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD), nicotinamide adenine

dinucleotide (NAD) is converted into NADH + H⁴. In the presence of diaphorase, NADH + H⁴ is further converted into NAD while nitroblue tetrazolium (NBT) is converted into diformazan. The total bile acid concentration in blood is determined from the increase in absorbance due to

5 the generation of diformazan.

AUTOMATED DETERMINATION OF TOTAL BILE ACID IN SERUM AND REAGENT THEREFOR

Patent number: JP60214900
Publication date: 1985-10-28
Inventor: KAWAGUCHI YOSHIHIRO; others: 03
Applicant: FUJIMOTO DAIAGUNOSUTEITSUKUSU:KK
Classification:
- international: C12Q1/32; G01N33/50
- european:
Application number: JP19840072557 19840410
Priority number(s):

Abstract of JP60214900

PURPOSE:The concentration of bile acid as a substrate is determined by calculating the change rate in absorptivity of the characteristic absorption of diformazan which is formed by the reaction in the enzyme colorimetry.

CONSTITUTION:The serum to be assayed is combined with (A) a buffer solution containing NADH₂-dependent diaphorase, nicotinamide adenine dinucleotide and nitroblue tetrazolium and (B) another buffer solution containing 3 α -hydroxysteroidaldehyde dehydrogenase. The total bile acid concentration in serum as the test specimen is determined from the change rate of the absorptivity in the characteristic absorption (540nm) of diformazan formed by the reaction.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-214900

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)10月28日

C 12 Q 1/32
G 01 N 33/50

8213-4B
Z-8305-2G

審査請求 未請求 発明の数 2 (全5頁)

⑮ 発明の名称 血清中総胆汁酸濃度の自動分析測定方法および測定試薬

⑯ 特 願 昭59-72557

⑰ 出 願 昭59(1984)4月10日

⑱ 発 明 者 川 口 芳 広 藤井寺市北条町11の46
⑱ 発 明 者 島 田 正 彦 松原市一津屋町117
⑱ 発 明 者 穴 井 泉 堺市七道西町12の8
⑱ 発 明 者 藤 本 導 太 郎 富田林市宮町3丁目2008番地の1
⑰ 出 願 人 株式会社 フジモト・ 松原市西大塚1丁目4番10号
ダイアグノスティック
ス
⑲ 代 理 人 弁理士 宮崎 新八郎

明 細 書

1. 発明の名称

血清中総胆汁酸濃度の自動分析測定方法および測定試薬

2. 特許請求の範囲

(1) 検体血清に、NADH₂依存型ジアホラーゼ0.2～10.0単位/ml、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド 1.0×10^{-4} ～ 10.0×10^{-4} Mおよびニトロブルーテトラゾリウム0.05～0.5mg/mlを含有するpH6.5～7.5の緩衝液である酵素試液Aと、3 α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ0.1～1.0単位/mlを含むpH6.5～7.5の緩衝液である酵素試液Bとを添加し、胆汁酸を基質とする反応により生成するジホルマザンの特性吸収における吸光度の単位時間当りの増加量を測定することをも特徴とする血清中総胆汁酸濃度の自動分析測定方法。

(2) 酵素試液Aおよび酵素試液Bの少なくともいずれか一方が、ラクテート・デヒドロゲナーゼ活性阻害剤としてビルビン酸塩 0.5×10^{-2} ～ 2.0

$\times 10^{-2}$ Mおよび/またはオキサム酸 1.0×10^{-2} ～ 5.0×10^{-2} M含有する上記第(1)項に記載の自動分析測定方法。

(3) トリトンX-100 0.1～0.5g/dlを含むpH6.5～7.5の緩衝液に、NADH₂依存型ジアホラーゼ0.8～40.0単位/ml、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド 4.0×10^{-4} ～ 40.0×10^{-4} M、ニトロブルーテトラゾリウム0.2～2mg/mlおよび牛血清アルブミン0.05～0.1g/dlを溶解した溶液の凍結乾燥物である酵素試液Aと、トリトンX-100 0.1～0.5g/dlを含むpH6.5～7.5の緩衝液に、3 α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ0.4～40単位/ml、牛血清アルブミン0.05～0.1g/dlを溶解した溶液の凍結乾燥物である酵素試液Bと、トリトンX-100 0.1～0.5g/dlを含むpH6.5～7.5の緩衝液である溶解液の組合せになる血清中総胆汁酸濃度の自動分析測定用試薬。

(4) 酵素試液Aの凍結乾燥物の使用時溶解液、酵素試液Bの凍結乾燥物の使用時溶解液、または溶

溶液の少くともいづれか1つが、ラクテート・デヒドロゲナーゼ活性阻害剤としてビルビン酸塩 $0.5 \times 10^{-2} \sim 2.0 \times 10^{-2} M$ および/またはオキサム酸 $1.0 \times 10^{-2} \sim 5.0 \times 10^{-2} M$ を含有するものである上記第(3)項に記載の自動分析測定用試薬。

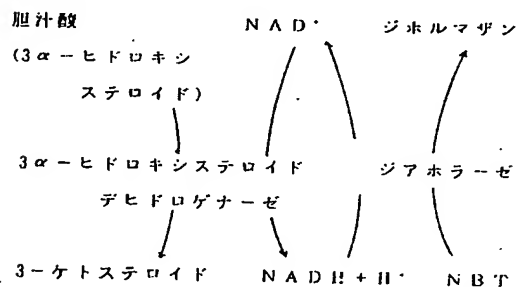
3. 発明の詳細な説明

本発明は、血清中総胆汁酸濃度の自動分析測定方法およびその測定試薬に関する。

コレステロールからの胆汁酸の合成、胆汁酸の胆汁中への排泄、並びに血中からの胆汁酸の取込み等の機能は、肝細胞のみによってなされるものであり、その機能が正常である限り、胆汁酸の大部分は極めて閉鎖的な回路の中に主として存在し、血中には微量にしか存在しない。このため胆汁酸は、古くから肝機能を知る重要な指標と考えられてきたにもかかわらず、測定が困難で、日常的に検査することができなかったのが実情である。

近年、ガスクロス法やラジオイムノアッセイ法が開発され、また酵素比色法という測定系も確立されている。しかし、ガスクロス法やラジオイム

ノアッセイ法は装置・施設などの点で実用性に乏しい。一方、酵素比色法は、下記のように、胆汁酸(3 α -ヒドロキシステロイド)を3 α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3 α -HSD)の作用により、3-ケトステロイドに変換する際に、ニコチンアミドアデニンジスクレオチド(NAD)をNADH+H⁺に変換し、更にジアホラーゼの存在下にNADH+H⁺をNADに変換するとともに、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)をジホルマザンに変換し、ジホルマザンの生成に伴う吸光度の増加から血中の総胆汁酸濃度を求めるものである。



しかしながら、現在までのところ、上記酵素比色法は、用手法により行なわれており、基質となり得る胆汁酸を完全に消費し尽してしまうまで反応を進行させるエンドポイントアッセイ法が実用化されているに過ぎない。その測定法による胆汁酸の測定に当たっては、検体血清を、ブランク測定用として余分に測定に供する必要がある、そのために誤差などを生じ易いという欠点がある。同法を自動分析装置に適用する場合にも、やはりブランク測定用のチャンネルが余分に必要となる。また、現在使用されている自動分析機はその測定形式上、エンドポイント法の適用できる機種に制限があり、多くの場合自動分析を断念せねばならないのが実情である。

本発明は上記実情に対処するためになされたものであり、上記測定原理(反応原理)による酵素比色法において、ジホルマザンの生成に伴う単位時間当りの吸光度の増加量(吸光度変化率)により、基質となる胆汁酸を濃度依存的に測定するものである。

本発明方法によれば、検体血清に、NADH₂依存型ジアホラーゼ、ニコチンアミドアデニンジスクレオチド(NAD)、およびニトロブルーテトラゾリウム(NBT)を含む緩衝液(以下、「酵素試液A」)および3 α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3 α -HSD)を含む緩衝液(以下、「酵素試液B」)を添加し、反応により生成するジホルマザンの特性吸収(540nm)における吸光度変化率から、検体血清中の総胆汁酸濃度が求められる。

本発明に使用される酵素試液Aは、NADH₂依存型ジアホラーゼを0.2~10.0単位/ml、NADを $1.0 \times 10^{-4} \sim 10.0 \times 10^{-4} M$ およびNBTを0.05~0.5mg/ml含有するpH6.5~7.5の緩衝液(リン酸緩衝液、グッド緩衝液、トリス緩衝液など)であり、酵素試液Bは、3 α -HSDを0.1~1.0単位/ml含有するpH6.5~7.5の緩衝液(リン酸緩衝液、グッド緩衝液、トリス緩衝液など)である。

本発明の測定法は、ブランクを必要としない測

定形式であるから、非特異的反應として生起する危険性のあるラクトート・デヒドロゲナーゼ (LDH) の関与を防止するために、LDH 活性阻害剤として、ビルビン酸塩 (アルカリ金属塩等) およびオキサム酸を、単独または混合して酵素試液 A または酵素試液 B に含有させることが望ましい。ビルビン酸塩の含有量は $0.5 \times 10^{-2} \sim 2.0 \times 10^{-2}$ M、オキサム酸のそれは $1.0 \times 10^{-2} \sim 5.0 \times 10^{-2}$ M が適当である。

酵素試液 A および B による胆汁酸の測定は、酵素試液 A を第 1 試薬、酵素試液 B を第 2 試薬とし、第 2 試薬の添加を出発点として反応を開始させる 2 試薬系により行われるほか、測定前に酵素試液 A と B を適当な比率 (A/B: 約 2~10) で混合し、1 試薬系として反応を開始することもできる。

酵素試液 A および B は、それぞれ凍結乾燥物として準備され、測定開始に際して、これを pH 6.5~7.5 の緩衝液 (リン酸緩衝液、グッド緩衝液、トリス緩衝液等) からなる溶解液に溶解して所定濃度の酵素試液 A および B に調製される。酵素試

液 A および B の凍結乾燥物の処方には、賦形剤・安定化剤として牛血清アルブミンが使用される。溶解液には、液組成物の安定化・澄清化剤として 0.1~0.5 % トリトン (Triton) X-100 等の界面活性剤が添加されるほか、LDH 阻害剤としてのビルビン酸塩および/またはオキサム酸、防腐剤 (例えば、アジ化ナトリウム) 等が所望により添加される。なお、LDH 阻害剤は、溶解液に含有させる代りに、酵素試液 A または B に含有させてもよい (製剤上、酵素試液 A に含有させるのがよい)。

次に、酵素試液 A および B (凍結乾燥物)、並びに溶解液の処方および組成の具体例を示す。

(1) 溶解液

精製水に下記成分を溶解した 0.05~0.3 M リン酸緩衝液 (pH 6.5~7.5)。

リン酸 2 ナトリウム・12 水塩

・・・1.07~6.04 g/dl

リン酸 1 カリウム ・・・0.27~1.62 g/dl

アジ化ナトリウム ・・・0.1 g/dl

0.1~0.5 % トリトン X-100

・・・0.1~0.5 g/dl

(2) 酵素試液 A (凍結乾燥物)

溶解液に下記成分を溶解し、pH 6.5~7.5 に調節された溶液を凍結乾燥。

0.1~0.5 % トリトン X-100

・・・0.1~0.5 g/dl

ビルビン酸リチウム

・・・ $2 \times 10^{-2} \sim 8 \times 10^{-2}$ M

オキサム酸 ・・・ $4 \times 10^{-2} \sim 20 \times 10^{-2}$ M

牛血清アルブミン ・・・0.05~0.1 g/dl

NBT ・・・0.02~0.2 g/dl

NAD ・・・ $4 \times 10^{-4} \sim 40 \times 10^{-4}$ M

ジアホラーゼ ・・・0.8~40 単位/ml

(3) 酵素試液 B (凍結乾燥物)

溶解液に下記成分を溶解し、pH 6.5~7.5 に調節された溶液を凍結乾燥。

3 α -HSD ・・・0.4~40 単位/ml

牛血清アルブミン ・・・0.05~0.1 g/dl

次に、実施例により本発明の試薬の処方、並び

に血清中総胆汁酸濃度の自動測定について説明する。

実施例

(A) 試薬処方

(i) 溶解液

リン酸 2 ナトリウム・12 水塩 ・・・21.49 g

リン酸 1 カリウム ・・・5.44 g

アジ化ナトリウム ・・・1.0 g

トリトン X-100 ・・・2.0 g

上記各成分を精製水に溶解し、1 l とする。

(ii) 酵素試液 A (凍結乾燥物、但し、20 ml 用)

溶解液 5 ml につきのものを順次溶解し、pH 7.

0 に調整する。

トリトン X-100 ・・・10 mg

ビルビン酸リチウム ・・・20 mg

オキサム酸 ・・・40 mg

牛血清アルブミン ・・・5 mg

上記の溶解を確認したのち、次のものを溶解する。

NBT ・・・10 mg

NAD ・・・26.5 mg

ジアホラーゼ . . . 20.0単位
この溶液を凍結乾燥する。

(3) 酵素試液 B (凍結乾燥物、但し、20 ml 用)
溶解液 2.5 ml に次のものを溶解する。

牛血清アルブミン . . . 2.5 mg
3 α -HSD . . . 3.85単位

この溶液を凍結乾燥する。

(B) 血清中総胆汁酸の自動分析結果

前記処方による凍結乾燥物を溶解液に溶解して所定の成分を含有する pH 7.0 のリン酸緩衝液からなる酵素試液 A および B を調製し、酵素試液 A を第 1 試薬 (R₁)、酵素試液 B を第 2 試薬 (R₂) として、自動分析機 (機種: 日立 705 形) により血清中総胆汁酸濃度を測定した。測定入力パラメータを第 1 表に示す。測定領域の直線性を第 1 図に、マニュアル法との相関性を第 2 図に示す。

第 1 表 (入力パラメータ)

TEST CODE : BA
ASSAY CODE : 2-26-31
SAMPLE VOLUME : 20

第 2 図に示されるように、本発明による測定値は、マニュアル法による測定値 (同法での直線性の上限は 200 μ M) と極めて良い相関性を示す (回帰式: $Y = 0.9763X + 1.2557$ 、相関係数: $r = 0.9979$ 、試料数: $n = 27$)。

(C) LDH の影響

一定濃度の胆汁酸含有ブール血清に LDH を順次高活性に含むよう添加した試料について、前記処方 of 試薬を用いて胆汁酸濃度を測定し、第 3 図に示す結果を得た。図に示されるとおり、通常血清中に予期される LDH 活性レベル (~2000 単位) 内において、胆汁酸濃度測定値の上昇は認められず、LDH の影響は完全に除去されていることがわかる。

以上のように、本発明によれば、従来のマニュアル法と異なる測定形式で、簡便な 2 試薬系にて血清中総胆汁酸の自動分析を行うことができる。むしろ、自動分析装置は前記例示のものに限られず、入力パラメータ等を設定するだけで、各機種 of 分析装置に適用することができる。

R₁ VOL : 350-Y
R₂ : 50-()-Y
R₃ :
WAVE LENGTH 1 : 700
WAVE LENGTH 2 : 546
REAGENT BLANK ABSORBANCE : 1
REAGENT BLANK CONCENTRATION : 0
STANDARD CONCENTRATION : 50*
FACTOR : 1
STANDARD ABSORBANCE ALLOWANCE : —
NORMAL RANGE 1 : —
NORMAL RANGE 2 : —
ABSORBANCE LIMIT (RATE) : 20000

(1) 測定領域の直線性

第 1 図に示されるように、血清総胆汁酸濃度として、約 200 μ M までは十分に直線的に測定可能である (回帰式: $Y = 0.9195X + 2.2576$ 、相関係数: $r = 0.9998$ 、試料数: $n = 20$)。これは、従来のマニュアル法よりもすぐれている。

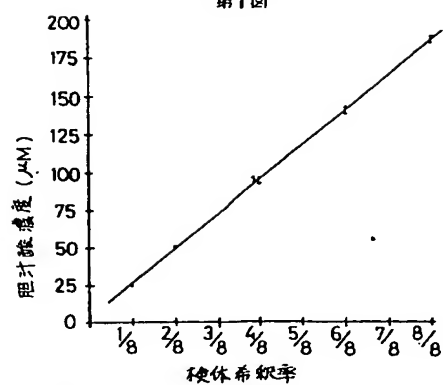
(2) マニュアル法との相関性

4. 図面の簡単な説明

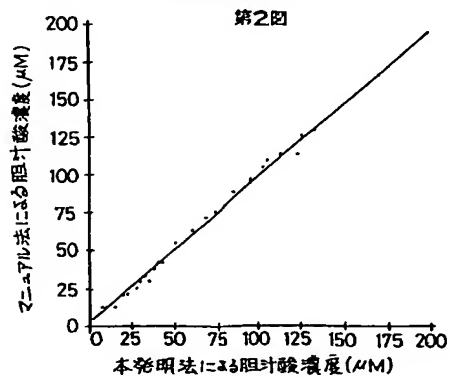
第 1 図は本発明による測定領域の直線性を示すグラフ、第 2 図は本発明測定値と従来のマニュアル法の測定値との相関性を示すグラフ、第 3 図は本発明の測定における LDH の影響を示すグラフである。

代理人 弁理士 宮崎新八郎

第1図



第2図



第3図

